

DOI:10.13350/j.cjpb.240509

• 论著 •

湖北省肾综合征出血热宿主带毒监测及病毒分子进化特征研究*

李阳丽¹, 胡兵^{2**}

(1. 武汉科技大学公共卫生学院, 湖北武汉 430065; 2. 湖北省疾病预防控制中心)

【摘要】 **目的** 了解湖北省肾综合征出血热(HFRS)宿主动物汉坦病毒感染状况,并对其进行病毒分子进行进化特征分析,为湖北省 HFRS 的防控提供科学依据。 **方法** 鼠肺标本用病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取组织 RNA 进行巢式 PCR 扩增,琼脂糖电泳分析及基因测序,采用 DNASTAR seqman 软件对测序所得序列与既往毒株基因序列进行比较,使用 MegAlign 软件进行同源性分析,采用 MEGA11.0 软件 Neighbor-Joining Method 构建系统进化树。 **结果** 本次调查共捕获宿主动物 1 603 只,优势宿主主要为黑线姬鼠 663 只,占比 41.36%(663/1603),其次为黄胸鼠与褐家鼠共 359 只,占比 22.40%(359/1603),为小家鼠 10.42%(167/1603)。共检出汉坦病毒阳性鼠 104 只,鼠总体带毒率为 6.49%,阳性鼠分类主要以黑线姬鼠和褐家鼠为主,分别占比 44.23%(46/104)和 20.19%(21/104)。病毒分子进化分析表明湖北省 2022 年测定的 42 份 HTNV 型病毒样本与湖北省 HV004 病毒株高度同源,12 份 SEOV 型病毒株与 WuhanRf02 同属于一个分支和亚分支,均未显示明显的变异。 **结论** 湖北省啮齿动物带毒情况结果显示黑线姬鼠和褐家鼠带毒率较高,该地区存在感染风险。病毒分子进化稳定,尚未出现明显变异,同时应进一步加强病毒监测。

【关键词】 肾综合征出血热;汉坦病毒;宿主监测;系统发育树

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)05-0539-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 May;19(5):539-543.]

Surveillance of host virulence and molecular evolution of hemorrhagic fever with renal syndrome in Hubei Province

LI Yangli¹, HU Bing² (1. School of Public Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065; China; 2. Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention)***

【Abstract】 **Objective** To understand the infection status of hantavirus in host animals of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Hubei province, and to analyze the evolutionary characteristics of the virus, so as to provide scientific basis for the prevention and control of HFRS in Hubei Province. **Methods** Tissue RNA was extracted from rat lung samples by viral DNA/RNA extraction kit, and nested PCR amplification was performed. Agarose electrophoresis analysis and gene sequencing were performed. The sequence obtained was compared with the gene sequences of previous strains by DNASTAR seqman software, and homology analysis was performed by MegAlign software. Phylogenetic tree was constructed by MEGA11.0 software Neighbor-Joining Method. **Results** A total of 1603 host animals were captured in this survey. The dominant host animals were mainly *Apodemus agrarius* (663, 41.36%, 663/1603), followed by *Rattus flavithorax* (359, 22.40%, 359/1603) and *Rattus norvegicus* (167, 10.42%, 167/1603). A total of 104 hantavirus positive mice were detected, and the overall virus carrying rate was 6.49%. The positive mice were mainly *Apodemus agrarius* and *Rattus norvegicus*, accounting for 44.23% (46/104) and 20.19% (21/104), respectively. The molecular evolution analysis showed that 42 HTNV virus samples detected in Hubei province in 2022 were highly homologous to HV004 virus strain in Hubei province, and 12 SEOV virus strains and WuhanRf02 belonged to the same branch and subbranch, and did not show obvious variation. **Conclusion** The results of rodent infection showed that *Apodemus agrarius* and *Rattus norvegicus* had a high rate of virus infection in Hubei Province, suggesting that there was a risk of infection in this area. The molecular evolution of the virus is stable, and no obvious mutation has occurred. At the same time, virus surveillance should be further strengthened.

【Key words】 hemorrhagic fever with renal syndrome; hantavirus; host surveillance; phylogenetic tree

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. U20A20396)。

** **【通讯作者】** 胡兵, E-mail: 253183347@qq.com

【作者简介】 李阳丽(1996-), 女, 贵州人, 硕士研究生, 主要从事公共卫生与预防医学研究。E-mail: 2575873462@qq.com

肾综合征出血热(Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS), 又称流行性出血热。是由汉坦病毒感染引起, 经鼠类等啮齿动物传播, 以肾脏急性损伤为主要病理改变的自然疫源性疾病^[1]。由于 HFRS 在中国的分布极其广泛, 常见症状主要包括就是发热、头痛、腰痛、眼眶痛、以肾脏损害为主要临床表现, 因此又被称为流行性出血热^[2]。汉坦病毒有至少 40 个血清型/基因型, 能引起 HFRS 的有 7 个型^[3], 其中汉滩型和汉城型病毒为 HFRS 的主要病原体^[4]。汉坦病毒在环境中具有较强的生存能力, 可通过接触被病毒污染的物质而传播给人类^[5-6]。通过伤口接触病原体, 通过鼠排泄物产生气溶胶经过呼吸道而感染, 通过饮食病毒感染的水或食物而感染, 通过虫媒传播、寄生虫如恙螨^[7]等叮咬和母婴传播感染。病毒的传播和疫情的规模和流行度受到多种因素的影响, 如人口密度、环境因素、地理位置和社会经济条件等。湖北省肾综合征出血热(HFRS)的发病率曾经占全国前 10 位, 病死率占全国前 5 位^[8], 发病率与鼠带毒率呈正相关。因此, 连续的对宿主主动物监测, 对病毒进行进化和宿主带毒状态的研究, 有助于判断该疾病的未来趋势, 对于疾病的防控具有重要意义。

材料与方法

1 材料

1.1 样本采集 标本来源于 7 个监测点地区, 包括(十堰, 荆门, 荆州, 黄石, 咸宁, 襄阳, 宜昌), 共计 1603 份, 一般采用夹夜法采集宿主动物标本。在 HFRS 监测点进行宿主动物采集, 主要是在 2022 年的春夏季(3-5 月)和秋冬季(9-11 月)各采集标本 1 次, 采集区域包括居民区和其他野外环境。将捕获样本进行分类鉴定, 并进行鼠感染情况统计, 同时对鼠组织进行解剖取肺, 液氮保存, 送实验室进行检测。

1.2 鼠肺标本处理 无菌处理鼠样本, 解剖取出鼠肺组织标本, 用手术剪刀剪取适量的鼠肺组织放入无菌研磨管并加入钢珠, 加入一定体积的磷酸盐缓冲液, 采用组织研磨仪研磨成组织匀浆。将研磨管以 8 000 r/min(离心直径 11 mm)离心 5 min, 用于后续病毒检测。

1.3 主要试剂与仪器 荧光定量 PCR 仪(QuantStudio7 Flex)购于美国 Thermo 公司, 组织研磨仪(TissueLyserII)购于德国 Qiagen 公司, 台式冷冻离心机(5810R)购于德国 EPPENDORF 公司, 全自动核酸提取仪(GeneRotex96)购于西安天隆公司, 一步法病毒逆转录试剂盒(AgPath ID One-step RT-PCR KIT)购于美国 Thermo 公司, 病毒核酸提取试剂盒(DNA/RNA 提取试剂盒)购于西安天隆公司, cDNA

第 1 链合成试剂盒(PrimeScript™ 1stStrand cDNASynthesisKi)和 DNA 聚合酶(Premix Taq DNA)均购于日本 TAKARA 公司。

2 方法

2.1 病毒检测 使用天隆病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取组织 RNA, 加入鼠肺组织研磨后上清液 200 μL, 按照试剂盒推荐的程序设置好提取程序上机提取组织核酸, 得到 50 μL 病毒 RNA 装于 EP 管并 -80 °C 保存。使用汉滩型(HTNV)和汉城型(SEOV)汉坦病毒核酸检测试剂, 采用双重荧光定量 RT-PCR 法检测汉坦病毒基因型别(双重荧光定量 RT-PCR 反应的引物和探针序列见表 1), 在 96 孔 PCR 管中配置好扩增反应所需的全部体系 20 μL(反应体系 F(771-793) 0.5 μL, F(217-237) 0.5 μL, R(862-884) 0.5 μL, R(272-291) 0.5 μL, P(811-893) 0.25 μL, P(239-263) 0.25 μL, 2×Buffer 12.5 μL, 25×Enzyme 1 μL, D. D. W 4 μL), 然后再分别加入待测样本 RNA, 阴性对照, 阳性对照各 5 μL, 设定好扩增参数。扩增条件 50 °C 30 min; 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 共 45 个循环; 55 °C 30 s。每个循环结束后同时检测 FAM 和 VIC 通道荧光信号。使用实时荧光定量 RT-PCR 法对样本进行检测。

表 1 双重荧光 RT-PCR 反应的引物和探针序列
Table 1 Primer and probe sequences for the duplex fluorescent RT-PCR reaction

基因型 Genotype	引物名称 Primer names	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	荧光/淬灭基团 Fluorescence/ Quench groups
HTNV 型	HTNV-F	GCTTCTCCAGATACAGCAGCAG	FAM/BHQ-1
	HTNV-R	GCCTTTGACTCCTTTGTCTCCAT	
	HTNV-P	CCTGCAACAACAGGGAYTACTTACGGCA	
SEOV 型	SEOV-F	GATGAACTGAAGCGCAACTT	VIC/BHQ-1
	SEOV-R	CCCTGTAGGATCCCGGTCTT	
	SEOV-P	CCGACAGGATTGCAGCAGGGAAGAA	

2.2 M 片段 RT-PCR 扩增 根据《全国肾综合征出血热监测方案》^[9], 采用巢式 PCR 法分两轮扩增 M 片段部分序列, 扩增 HTNV 和 SEOV 型汉坦病毒的引物序列见表 2。过程按照 TAKARA PrimeScript 1stStrand cDNASynthesisKit 试剂盒说明书进行, 以提取好的 RNA 为模板采用随机引物进行逆转录反应合成 cDNA 第一条链, 先进行第一轮扩增。参考 2.1 反应条件, 再以第 1 轮扩增反应产物为模板, 分别用 HTNV、SEOV 型汉坦病毒巢式 PCR 特异性引物作为巢式内侧引物进行第二轮扩增, 扩增条件同一轮。取 5 μL PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 于含溴化乙锭(EB)的琼脂糖凝胶上电泳 30 min, 在紫外线透射仪下观察。

表 2 巢式 PCR 法扩增用引物序列

病毒型别	引物	序列(5'-3')	位置
Type of virus	Primer	Sequence (5'-3')	Location
通用外引物	Out-F	AAAGTAGGTGITAYATCYTIACAATGTGG	第一轮 PCR
	Out-R	GTACAICCTGTRCCIAACCC	
HTNV 病毒	In1-F	GAATCGATACTGTGGGCTGCAAGTGC	第二轮 PCR
	In1-R	GGATTAGAACCCAGCTCGTCTC	
SEOV 病毒	In2-F	GTGGACTCTTCTTCTCATTATT	
	In2-R	TGGGCAATCTGGGGGTTGCATG	

2.3 基因测序及构建系统发育树 将第二轮 PCR 扩增反应产物送武汉天一辉远生物科技有限公司进行 DNA 测序。构建系统发育树从 GenBank 上下载 HTNV 和 SEOV 标准株、湖北和其他地区毒株,使用 DNASTAR seqman 程序针对与扩增片段位置相同的 M 片段部分基因进行序列比对,使用 MegAlign 软件进行同源性分析,使用 MEGA11.0 软件 Neighbor-Joining Method 构建系统进化树。

结 果

1 宿主动物监测概况

各监测点共捕鼠 1 603 只,平均鼠密度 0.43%(表 3),分别为白腹巨鼠 1 只,褐家鼠 359 只,黑线仓鼠 1 只,黑线姬鼠 663 只,黄毛鼠 16 只,黄胸鼠 359 只,社鼠 17 只,小家鼠 167 只,鼯鼯类 8 只,其他 12 只。其中室内捕鼠 304 只,鼠密度 0.11%。野外捕鼠 1 299 只,鼠密度 0.33%。湖北省优势宿主主要为黑线姬鼠,黄胸鼠,褐家鼠和小家鼠,其中黑线姬鼠 663 只,占比 41.36%(663/1603),其次为黄胸鼠与褐家鼠为 359 只,占比 22.40%(359/1603),最后为小家鼠 10.42%(167/1603)。

表 3 宿主动物标本采集情况表
Table 3 Collection of host animal specimens

动物种属	数量	合计	
Species of animals	Number	Total	
鼠科	黑线姬鼠	663	1582
	褐家鼠	359	
	黄胸鼠	359	
	小家鼠	167	
	社鼠	17	
	黄毛鼠	16	
鼯鼯科	白腹巨鼠	1	8
	鼯鼯类	8	
仓鼠科	黑线仓鼠	1	1
其他	其他	12	12

2 鼠类携带病毒情况

对 1 603 份鼠肺组织标本进行病毒核酸检测,结果总体感染率 6.49%(104/1603),其中感染的鼠类分别为黑线姬鼠 46 只,褐家鼠 21 只,黄胸鼠 15 只,小家鼠 7 只,社鼠 4 只,鼯鼯类 4 只,白腹巨鼠 1 只,其他 6

只。各地区的宿主动物汉坦病毒阳性率中,最高为咸宁 19.00%(38/200)。在居民区和野外捕捉的样本中,居民区和野外区宿主动物汉坦病毒感染率分别为 8.49%(18/212),6.18%(86/1391);居民区鼠种感染率中占比黑线姬鼠 33.33%(1/3),褐家鼠 6.94%(5/72),黄胸鼠 18.87%(10/53),小家鼠 1.20%(1/83),鼯鼯类 100.00%(1/1);野外区黑线姬鼠 6.67%(44/660),褐家鼠 5.57%(16/287),黄胸鼠 1.62%(5/308),小家鼠 7.14%(6/84),社鼠 23.53%(4/17)白腹巨鼠 100.00%(1/1),鼯鼯类 42.86%(3/7),其他 50.00%(6/12)(表 4)。

表 4 不同种属宿主动物携带病毒情况表
Table 4 Table of viruses carried by host animals of different species

动物种属	数量		病毒携带数		基因型别	
	居民区	野外	居民区	野外	HTNV 型	SEOV 型
Species of animals	Residential area	Field	Residential area	Field		
黑线姬鼠	3	660	1	45	37	8
褐家鼠	72	287	5	16	8	9
黄胸鼠	53	306	10	5	5	6
小家鼠	83	84	2	5	1	3
社鼠	0	17	0	4	3	1
黄毛鼠	0	16	0	0	0	0
白腹巨鼠	0	1	0	1	1	0
鼯鼯类	1	7	1	3	3	1
其他	0	12	0	6	2	3
黑线仓鼠	0	1	0	0	0	0

表 5 不同地区宿主动物与病毒携带情况
Table 5 Host animals and virus carriage in different regions

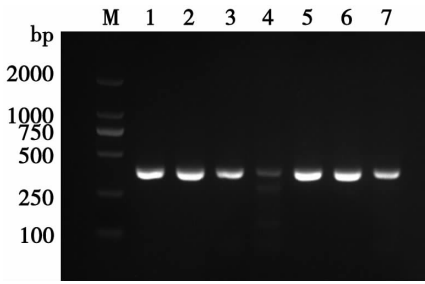
地区	病毒携带数		病毒基因分型	
	居民区	野外	HTNV	SEOV
Region	Residential area	Field		
咸宁	3	35	22	9
十堰	4	11	0	4
襄阳	7	10	4	11
荆门	8	9	7	6
荆州	2	34	27	1
黄石	0	0	0	0
宜昌	0	0	0	0

3 病毒 M 片段的琼脂糖凝胶电泳分析图

将巢式 PCR 第二轮扩增的 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果在 418bp 位置处有一特异扩增条带,片段大小和预期相符(图 1)。

4 病毒分子进化分析

4.1 HTNV 型病毒的分子进化分析 对 PCR 扩增产物进行测序分析,构建系统发生树,表明 HTNV 型汉坦病毒和 SEOV 型汉坦病毒在进化上分别处于两个明显的进化分支。其中有 42 份样本的基因测序分型为 HTNV 型,进化树见图 2。



M DL2000 DNA Marker 1~7 第二轮扩增产物

图1 病毒部分M片段的琼脂糖凝胶电泳图

M DL2000 DNA Marker 1-7 Second round amplification products

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the partial M fragment of the virus

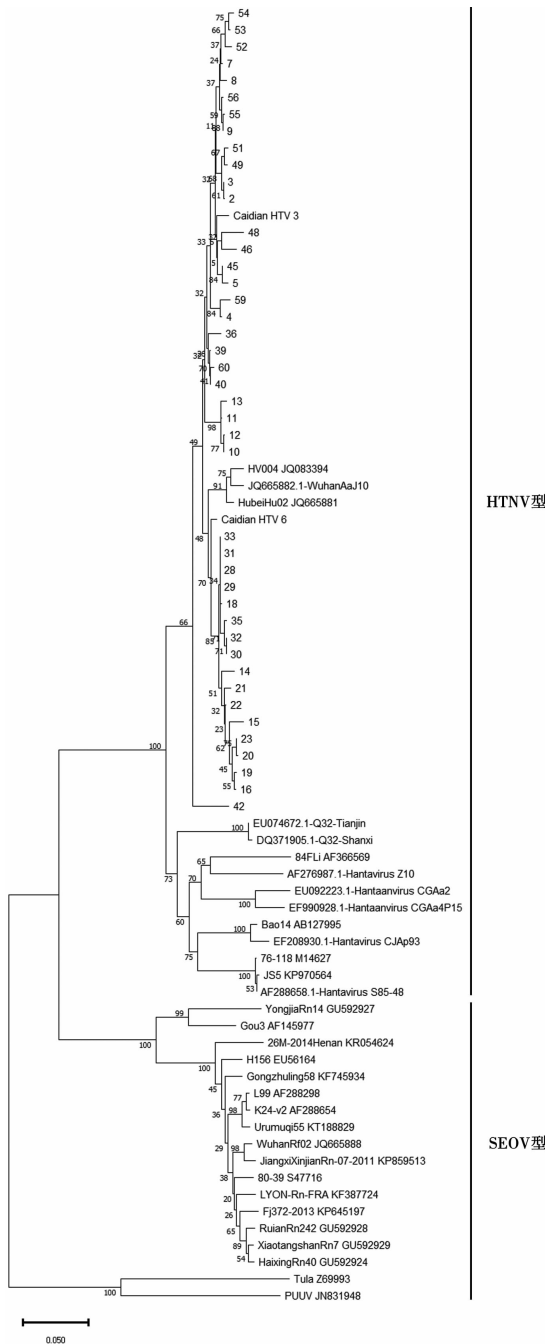


图2 HTNV型汉坦病毒的分子进化树图

Fig. 2 Molecular phylogenetic tree of HTNV-type hantaviruses

4.2 SEOV型病毒的分子进化分析 DNA测序结果表明,湖北省2022年的样本63、66、67、68、70、75、78、80、81、82、89、91基因测序分型为SEOV型,分子进化树见图3。

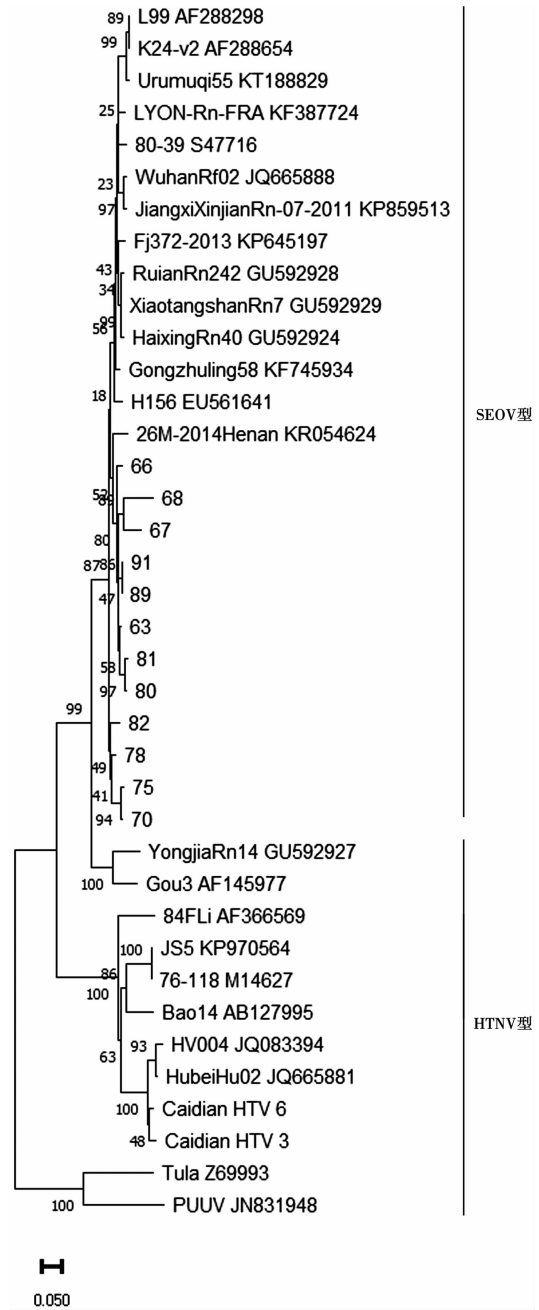


图3 SEOV型汉坦病毒的分子进化树图

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree of SEOV-type hantaviruses

讨论

肾综合征出血热是一种由汉坦病毒等引起的急性传染病。该疾病是主要通过啮齿动物传播^[10]发病率与鼠带毒率密切相关。湖北省自1957年有病例之后,每年都有报告。80年代到达顶峰,2003年之后呈现逐年下降的平稳趋势,2015年之后情况变得缓慢,呈现局部波动状态,2017年呈上升趋势^[11]。2021年,湖北

省肾综合征出血热(HFRS)的发病率占全国前10位,病死率占全国前5位^[8]。

通过对1603只宿主动物进行监测,分析鼠类携带汉坦病毒的感染情况,并对病毒M片段进行琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明,湖北省优势宿主为黑线姬鼠、黄胸鼠、褐家鼠和小家鼠,与历年样本特征一致^[12]。病毒核酸检测显示,总体感染率为6.49%,其中黑线姬鼠、褐家鼠、黄胸鼠和小家鼠感染率较高,优势宿主中黑线姬鼠带毒率为6.94%,褐家鼠带毒率为5.85%。由于传染源存在差异,导致不同地区和不同宿主之间可能存在差异性^[13],咸宁,襄阳,荆州,荆门检测出两种型别,十堰为SEOV型。其中荆州市HFRS疫情处于较高水平与鼠活动密切相关^[14]。但在宜昌和黄石未检出,可能是样本的采集存在采样误差也可能该地区既往流行水平较低。环境因素,气候等对病毒的传播和宿主数量有显著影响^[15-16]。

本研究中有42份样本的基因测序分型为HTNV型(详细见图2),上述42份鼠肺样本中的病毒同近年来湖北省武汉市的Caidian HTV_3、Caidian HTV-6和HV004、Hubei Hu02、WuhanAaJ10同属于一个分支和亚分支,亲缘关系最近,表明湖北省近年来HTNV型汉坦病毒在分子进化上未发生明显,均与湖北省优势株HV004高度同源。但上述病毒同我国北京、浙江、贵州等省份的HTNV型汉坦病毒84FLi、Baol4、84FLi、Hantaanvirus Z10、Hantaanvirus CJAA2等的亲缘关系较远,不属于同一亚分支。

样本63、66、67、68、70、75、78、80、81、82、89、91基因测序分型为SEOV型,上述12份鼠肺样本中的病毒同近年来湖北省武汉市的WuhanRf02同属于一个分支和亚分支,亲缘关系最近。上述病毒同我国江西、河南、吉林、北京等省份的SEOV型汉坦病毒JiangxiXinjiangRn-07-2011、26M-2014Henan、Gongzhuling58、XiaotangshanRn7等亲缘关系较近,与武汉市的WuhanRf02同属于一个分支和亚分支,未显示出明显的变异,提示与既往本省的汉坦病毒株相比,病毒变异程度较小,保持相对稳定。

本研究仅对湖北省部分地区的宿主动物进行了监测,未来还需扩大监测范围,以更全面地了解汉坦病毒在湖北省的流行情况和分子进化特征。同时,针对不同地区的病毒感染情况和宿主分布,制定针对性的防治措施,降低汉坦病毒引发的疾病风险。

随着人们生活水平的提高,个人防护意识的不断加强,环境卫生的加强,防鼠灭鼠等措施的实施,疫苗

的接种工作和媒体的宣传与教育活动的开展,以至于人们接触野生动物的机会大大减少,进一步减少疾病的感染。

综上所述,肾综合征出血热宿主带毒监测是一项必要且重要的基础性工作,可以提供有关疾病传播方式、宿主动物的分布情况以及人群感染的风险评估等信息。通过有效的监测和控制措施,可以更好地预防和控制这种疾病的传播并保障人民的健康和安全。

【参考文献】

- [1] 尚翠,张全福,殷强玲,等.汉坦病毒病流行影响因素分析[J].中华流行病学杂志,2020,41(6):968-974.
- [2] Zhang S, Wang S, Yin W, et al. Epidemic characteristics of hemorrhagic fever with renal syndrome in China, 2006-2012[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14:384.
- [3] 周济华,张海林.汉坦病毒分型及致病性的研究进展[J].国际病毒学杂志,2008,15(2):37-42.
- [4] 张琼娜,段春丽,张绍琼,等.2009-2019年祥云县流行性出血热流行特征分析[J].国际病毒学杂志,2021,28(1):28-31.
- [5] Pedrosa PB, Cardoso TA. Viral infections in workers in hospital and research laboratory settings: a comparative review of infection modes and respective biosafety aspects[J]. Int J Infect Dis, 2011, 15(6):e366-376.
- [6] Liu J, Xue FZ, Wang JZ, et al. Association of haemorrhagic fever with renal syndrome and weather factors in Junan County, China: a case-crossover study[J]. Epidemiol Infect, 2013, 141(4):697-705.
- [7] 唐家琪,万康林.自然疫源性疾病[M].北京:科学出版社,2005:121-130.
- [8] 邓雪飞,杜珊珊,黄晓霞,等.2004-2021年中国肾综合征出血热报告病例流行病学特征分析[J].疾病监测,2023,38(1):70-74.
- [9] 中华人民共和国卫生部.全国肾综合征出血热监测方案[Z].2005-09-09.
- [10] 张俊丽,肖寒.肾综合征出血热病原学、实验室检测、防治措施的研究进展[J].医学综述,2017(21):4303-4307.
- [11] Liu M, Liu L, Yang R, et al. Analysis on the monitoring of hemorrhagic fever with renal syndrome in Hubei from 2005-2019[J]. Clin Educ General Pract, 2021, 19(2):149-152.
- [12] 刘婧.湖北地区汉坦病毒与宿主的基因进化研究[D].武汉大学,2011.
- [13] 王妍,魏亚梅,韩旭,等.河北省肾综合征出血热疫区鼠类构成及其携带汉坦病毒调查[J].中国媒介生物学及控制杂志,2017,28(6):553-556.
- [14] 刘天,阮德欣,姚梦雷,等.2017-2020年湖北省荆州市肾综合征出血热流行特征及时空聚集性分析[J].疾病监测,2023,38(3):304-309.
- [15] 曹云贤,高琦,余凯丽,等.气象因素与肾综合征出血热发病关系的meta分析[J].中国病原生物学杂志,2022,17(1):59-64.
- [16] 曹丽娜.中国不同气候带肾综合征出血热的影响因素及预测模型研究[D].济南:山东大学,2020.

【收稿日期】 2023-11-08 【修回日期】 2024-02-01